

6 种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能比较与分析

郭元元, 王 昆, 张 宇, 张文佳, 王丽英, 廖 璞[△]

(重庆市人民医院三院院区检验科, 重庆 400014)

【摘要】目的 对不同的新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸检测试剂的检测性能进行比较和分析, 以供实验室参考。**方法** 收集该院 1 例弱阳性患者不同时间点采集的咽拭子标本, 选取 6 种国产试剂(A~F 试剂)平行检测, 进行 RNA 提取和扩增, 根据各试剂检测结果比较其性能。**结果** C 和 F 试剂 3 次平行检测结果(ORF1ab 和 N 基因)均为阳性, D 试剂均未检出 N 基因, A、B、E 试剂均有未检出 ORF1ab 情况存在; C 试剂批内重复检测结果最佳; F 试剂(N 和 ORF1ab)、E 试剂(ORF1ab)和 A 试剂(ORF1ab)3 次检测结果的 CT 值有趋势性变化。**结论** 6 种 2019-nCoV 核酸检测试剂对弱阳性样品的检测能力有差异, 部分试剂的准确性、灵敏度及重复性欠佳, 亟需进一步优化, 提高其性能, 以便更好地适应大规模的筛查需求。

【关键词】 2019 新型冠状病毒; 核酸检测; 试剂盒, 诊断; 性能比较

【中图法分类号】 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8348(2020)14-0-0

Comparison and analysis of the detection performance of six new coronavirus nucleic acid detection reagents

GUO Yuanyuan, WANG Kun, ZHANG Yu, ZHANG Wenjia, WANG Liying, LIAO Pu[△]

(Department of Laboratory Medicine, Chongqing General Hospital, Chongqing 400014, China)

【Abstract】 Objective To compare and analyse the detection performance of different 2019-new coronavirus (2019-nCoV) nucleic acid detection kits, in order to provide references for laboratory. **Methods** Six kinds of domestic reagents (A-F reagent) were selected for parallel detection of a series of samples from one patient in this hospital whose 2019-nCoV nucleic acid result was confirmed weakly positive. The samples were taken at three different times, the RNAs were extracted and amplified, and two parallel tests were performed each time by use of these six kits. The detection performance was compared according to the results of each kit. **Results** The three parallel test results (ORF1ab and N gene) of C and F reagents were positive, the results of D reagent showed the N gene was not detected, and the results of A, B, E reagents showed the ORF1ab gene was not detected sometimes. The reproducibility of in-batch detections by C reagent was the best, and the CT values of F reagents (N and ORF1ab), E reagents (ORF1ab) and A reagents (ORF1ab) showed changes in trend. **Conclusion** There are differences in the detection ability of six 2019-nCoV nucleic acid detection reagents for weakly positive samples, and the accuracy, sensitivity and reproducibility of some reagents are not good. There is an urgent need to further optimize and improve their performance in order to better meet the needs of large-scale screening.

【Key words】 2019 new coronavirus; nucleic acid detection; reagent kits, diagnostic; performance comparison

目前, 实时荧光 RT-PCR 检测 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸阳性是新型冠状病毒肺炎(以下简称“新冠肺炎”)诊断的金标准^[1], 但有临床医生发现, 新冠肺炎影像学表现与核酸检测结果有不一致的病例, 也出现了诸如“检测 4 次, 才发现核酸阳性”“CT 结果来做确诊, 不要迷信核酸”等具有争议的报道。核酸检测具有早期、敏感、特异性高、易操作等优势, 但对于核酸检测结果的准确性, 需要从样本类型、质

量、实验因素、试剂盒性能及患者感染周期等影响因素来综合分析^[2], 尤其针对难诊断病例应当更加严格地控制检测准确性。本研究拟通过对 1 例 2019-nCoV 感染患者不同时间点送检标本、不同试剂检测结果进行比较分析, 评价不同试剂盒性能, 发现和提出目前 2019-nCoV 核酸检测试剂盒需要改进之处, 提高筛查准确性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集本院 1 例发热门诊患者(男,51 岁)在不同时间点(2020-01-27、2020-01-31、2020-02-01)采集的 3 次咽拭子标本。

1.2 方法

1.2.1 试验试剂

选取 6 个不同企业生产的试剂盒,分为 A~F 共 6 组。A 组:采用生物新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸快速检测试剂盒(PCR-荧光探针法,批号:2020001),提取试剂盒(批号:2020001);B 组:采用新型冠状病毒(2019-nCoV)ORF1ab/N 基因免核酸提取 RNA 检测试剂盒(PCR-荧光探针法,批号:T2001-27Y);C 组:采用生物新型冠状病毒(2019)核酸检测试剂盒(双重荧光 PCR 法,批号:20200108);D 组:采用生物新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法,批号:H200104);E 组:采用 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)ORF1ab/N 核酸检测试剂盒(批号:2020001),提取或纯化试剂盒(批号:2019003);F 组:采用新型冠状病毒(2019-nCoV)ORF1ab/N 基因双重实时荧光 PCR 检测试剂盒(批号:20200123)。

1.2.2 检测方法

实验人员严格按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》(卫办医政发[2010]194 号)^[3]、《国家卫生健康委办公厅关于印发新型冠状病毒实验室

生物安全指南(第二版)的通知》(国卫办科教函[2020]70 号)^[4]及《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第二版)》^[5]相关文件进行实验操作和生物安全防护。(1)RNA 提取:使用圣湘生物 Nathch CS 全自动核酸提取系统和中山达安 Smart32 核酸提取仪,严格按照试剂说明书进行提取。(2)核酸扩增:使用 ABI7500PCR 仪根据不同厂家试剂说明书设置反应程序后扩增检测并对检测结果进行阴性、阳性的判定。(3)质量控制:每批试验均带阴性和阳性对照,阴性和阳性对照检测结果在控,则该批次试验有效,反之,无效。

1.3 统计学处理

采用 Excel2003 及 SPSS17.0 统计软件,通过计算变异系数(CV)比较不同试剂的批内重复性。

2 结果

2.1 各试剂的基本情况

各试剂的基本情况比较见表 1。6 种试剂检测基因类型均为 ORF1ab 和 N 基因,A 和 D 试剂含内标;A 和 B 试剂可采用一步裂解法提取核酸,其余试剂均可采用磁珠法或柱提法(本研究未采用)提取核酸;C 和 E 试剂最低检测限为 1 000 copies/mL,F 试剂说明书未提及,其余均为 500 copies/mL;6 种试剂 RNA 上样量、荧光检测和扩增循环数及结果判断稍有差异。本研究采用的标本类型为咽拭子,6 种试剂均适用。本研究仅针对相应批号试剂。

表 1 各试剂的基本情况比较

| 试剂 | 检测基因 | 核酸提取方法 | RNA 量(μL) | 荧光检测和扩增循环数 | 结果判断 | | 最低检测限(copies/mL) | 是否含内标 |
|----|----------|---------|-----------|-------------|---------|---------|------------------|-------|
| | | | | | 阳性 | 阴性 | | |
| A | ORF1ab、N | 磁珠法/一步法 | 10/20 | 60 °C,45 循环 | CT 值≤40 | CT 值>40 | 500 | 是 |
| B | ORF1ab、N | 一步法 | 7.5 | 55 °C,30 循环 | CT 值≤30 | CT 值>30 | 500 | 否 |
| C | ORF1ab、N | 磁珠法 | 5 | 55 °C,45 循环 | CT 值≤35 | CT 值>38 | 1 000 | 否 |
| D | ORF1ab、N | 磁珠法 | 10 | 60 °C,40 循环 | CT 值<37 | CT 值≥40 | 500 | 是 |
| E | ORF1ab、N | 磁珠法 | 5 | 55 °C,45 循环 | CT 值≤38 | CT 值>38 | 1 000 | 否 |
| F | ORF1ab、N | 磁珠法 | 5 | 60 °C,45 循环 | CT 值≤36 | CT 值>40 | — | 否 |

—:未提及。

2.2 不同试剂的检测结果分析

对该患者的 3 次采样样品分别采用不同试剂核酸检测,结果见表 2。C 和 F 试剂检测 ORF1ab 和 N 基因 3 次结果均为阳性,但结果曲线图 C 试剂优于 F 试剂,见图 1;D 试剂均未检出 N 基因,A、B、E 试剂均有未检出 ORF1ab 情况存在。其中 A 试剂检出率 66.6%(4/6),B 试剂试剂检出率 66.6%(4/6)、C 试剂试剂检出率 100.0%(6/6)、D 试剂试剂检出率 50.0%(3/6)、E 试剂试剂检出率 83.3%(5/6)、F 试剂试剂检出率 100.0%(6/6)。

表 2 不同试剂的检测结果

| 试剂 | 样品编号 | 检测位点及结果 | |
|----|----------------|---------|--------|
| | | N | ORF1ab |
| A | 20200127312001 | 阳性 | 未检出 |
| | 20200131312001 | 阳性 | 未检出 |
| | 20200201312001 | 阳性 | 阳性 |
| B | 20200127312001 | 阳性 | 阳性 |
| | 20200131312001 | 阳性 | 未检出 |
| C | 20200201312001 | 阳性 | 未检出 |
| | 20200127312001 | 阳性 | 阳性 |
| | 20200131312001 | 弱阳性 | 弱阳性 |

| | | | |
|---|----------------|-----|-----|
| | 20200201312001 | 弱阳性 | 阳性 |
| D | 20200127312001 | 未检出 | 阳性 |
| | 20200131312001 | 未检出 | 阳性 |
| | 20200201312001 | 未检出 | 阳性 |
| E | 20200127312001 | 弱阳性 | 未检出 |
| | 20200131312001 | 弱阳性 | 阳性 |
| | 20200201312001 | 弱阳性 | 阳性 |
| F | 20200127312001 | 阳性 | 阳性 |
| | 20200131312001 | 阳性 | 阳性 |
| | 20200201312001 | 阳性 | 阳性 |

A: C 试剂; B: F 试剂。

图 1 不同试剂检测结果曲线图

2.3 不同试剂重复检测结果 CT 值

6 种试剂(A~F)重复检测结果 CT 值见表 3, 批内检测结果的 CV 见表 4。结果显示: C 试剂的批内重复性最佳(CV 最小), B 试剂第 3 次检测 ORF1ab 批内变异系数(CV 批内)最大, 其余试剂(A、D、E、F)批内重复性检测结果 CT 值差异不明显。

2.4 各试剂动态检测结果平均 CT 值 该患者不同时间点取样各试剂检测检测结果平均 CT 值见表 5, F 试剂(N 和 ORF1ab)和 E 试剂(ORF1ab)3 次检测结果的 CT 值越来越小, A 试剂(ORF1ab)第 3 次结果小于前两次结果, 其余试剂 3 次检测结果 CT 值无趋势性变化(图 2)。

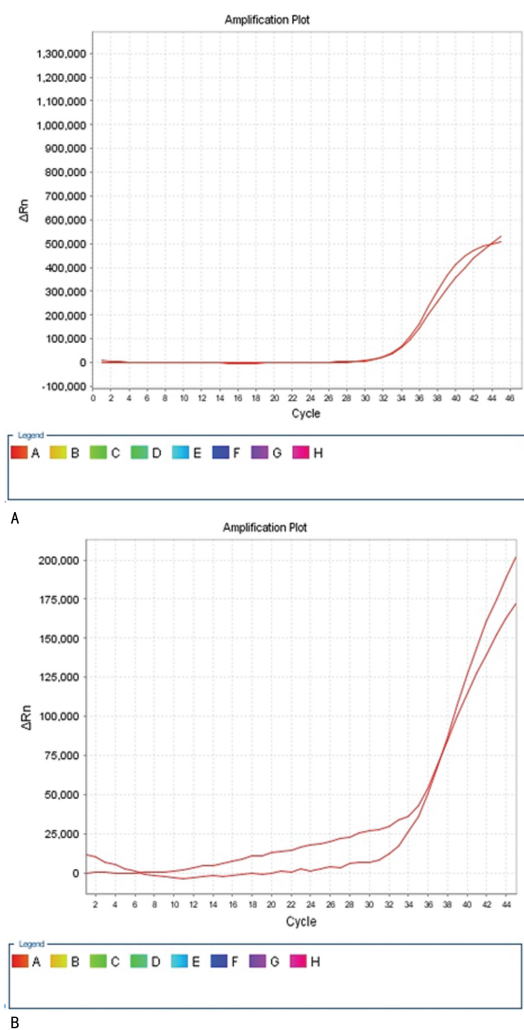


表 3 不同试剂重复检测结果 CT 值分析

| 试剂 | 检测位点 | 样品编号 | | |
|----|---------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 20200127312001 | 20200131312001 | 20200201312001 |
| A | N(第 1 次) | 37.02 | 32.73 | 34.22 |
| | N(第 2 次) | 37.3 | 34.03 | 35.11 |
| | ORF1ab(第 1 次) | >40 | >40 | 34.03 |
| | ORF1ab(第 2 次) | >40 | >40 | 32.73 |
| B | N(第 1 次) | 18.39 | 20.81 | 20.5 |
| | N(第 2 次) | 19.9 | 19.62 | 21.64 |

| | | | | |
|---|---------------|-------|-------|-------|
| | ORF1ab(第 1 次) | 21.23 | >30 | >30 |
| | ORF1ab(第 2 次) | 23.06 | >30 | 21.85 |
| C | N(第 1 次) | 33.83 | 37.13 | 34.73 |
| | N(第 2 次) | 33.94 | 37.73 | 35.01 |
| | ORF1ab(第 1 次) | 33.28 | 36.7 | 34.38 |
| | ORF1ab(第 2 次) | 33.62 | 37.1 | 34.4 |
| D | N(第 1 次) | ≥40 | ≥40 | ≥40 |
| | N(第 2 次) | ≥40 | ≥40 | ≥40 |
| | ORF1ab(第 1 次) | 34.11 | 33.72 | 36.34 |
| | ORF1ab(第 2 次) | 33.31 | 33.23 | 35.29 |
| E | N(第 1 次) | 42.7 | 41.23 | 41.65 |
| | N(第 2 次) | 41.3 | 42.1 | 42.51 |
| | ORF1ab(第 1 次) | >38 | 37.9 | 36.5 |
| | ORF1ab(第 2 次) | >38 | 37.6 | 35.2 |
| F | N(第 1 次) | 34.25 | 34.13 | 27.16 |
| | N(第 2 次) | 35.61 | 32.16 | 29.13 |
| | ORF1ab(第 1 次) | 33 | 33.0 | 30.06 |
| | ORF1ab(第 2 次) | 34.12 | 31.03 | 28.65 |

表 4 不同试剂重复检测结果的 CV(%)

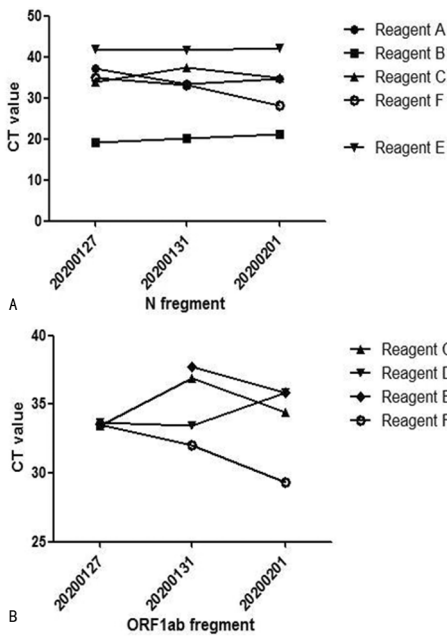
| 试剂 | N | | | ORF1ab | | |
|----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 20200127312001 | 20200131312001 | 20200201312001 | 20200127312001 | 20200131312001 | 20200201312001 |
| A | 0.53 | 2.75 | 1.82 | — | — | 2.75 |
| B | 5.58 | 4.16 | 3.83 | 5.84 | — | — |
| C | 0.23 | 1.13 | 0.57 | 0.72 | 0.77 | 0.04 |
| D | — | — | — | 1.68 | 1.04 | 2.07 |
| E | 2.36 | 1.48 | 1.45 | — | 0.56 | 2.56 |
| F | 2.75 | 4.2 | 4.95 | 2.36 | 4.35 | 3.4 |

—:无数据。

表 5 各试剂不同时间检测结果平均 CT 值

| 检测日期 | A | | B | | C | | D | | E | | F | |
|------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-----|--------|-------|--------|-------|--------|
| | N | ORF1ab | N | ORF1ab | N | ORF1ab | N | ORF1ab | N | ORF1ab | N | ORF1ab |
| 2020-01-27 | 37.16 | >40 | 19.15 | 22.15 | 33.89 | 33.45 | ≥40 | 33.71 | 42 | >38 | 34.93 | 33.56 |
| 2020-01-31 | 33.38 | >40 | 20.22 | >30 | 37.43 | 36.9 | ≥40 | 33.48 | 41.67 | 37.75 | 33.15 | 32.02 |
| 2020-02-01 | 34.67 | 33.38 | 21.07 | — | 34.87 | 34.39 | ≥40 | 35.82 | 42.08 | 35.85 | 28.15 | 29.36 |

—:无数据。



A: N 基因; B: ORF1ab 基因; 图中未标出 A、B、D 试剂未检出情况。

图 2 各剂不同时间检测结果图

3 讨论

本研究比较了 6 种国产试剂对弱阳性新冠肺炎患者核酸在不同时期采样的检测结果,结果显示:C 试剂和 F 试剂检测能力较好,对 2019-nCoV(ORF1ab 和 N 基因)均能检出;D 试剂对 2019-nCoV(N 基因)缺乏检测能力;A、B、E 试剂对 2019-nCoV(ORF1ab)检测能力需进一步提高;C 试剂批内重复检测结果最理想;F 试剂(N 和 ORF1ab)、E 试剂(ORF1ab)和 A 试剂(ORF1ab)3 次检测结果的 CT 值有趋势性变化。

本研究结果表明,国产 6 种试剂对弱阳性样品的检测能力参差不齐,少数试剂对 2019-nCoV(ORF1ab 和 N 基因)均能检出,而部分试剂只能检测出其中一个。从试剂方面分析原因:(1)可能与试剂引物设计有关;(2)与各位点检测灵敏度相关。弱阳性样品往往对试剂盒的灵敏度有较高要求,如果最低检出限达不到样品的检测浓度,则会导致假阴性结果^[6]。而如何判断,则需要对试剂盒上的性能参数进行验证。

该患者为感染初期到确诊的患者。理论上,病毒载量应该越来越高,所对应检测结果的 CT 值应该越来越小^[7],但本研究中仅 3 种试剂有趋势性变化,表明各试剂的准确性和重复性有待提高。且从平行检测结果看,各试剂批内重复性也不一致。因此,实验室在使用新试剂前,或在更换试剂批号时,应做相应的性能验证,以满足实验室的检测要求^[8]。

新冠肺炎疫情属于突发公共卫生事件,各试剂商在最短时间内完成了核酸检测试剂盒的研发和审批,对试剂盒质量和性能参数设置难免有瑕疵,各试剂商也在不停的更新和优化中。但作为实验室,操作人员应在生物安全防护下严格遵循标准操作流程,严格质

量控制,避免由于操作原因引起假阴性和假阳性结果,正确认识和看待检测结果。

本研究仅仅对各试剂某一批号的检测能力做了简要比较分析,样本量有限,并不能代表各试剂的整体检测性能。由于本院阳性确诊的病例数较少,因此研究对象缺乏,如有条件,需扩大样本量,进一步对不同试剂的核酸提取质量等指标进行有效评价,以满足临床所需。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第五版)[OB/OL]. (2020-02-04) [2020-02-06]. <http://bgs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-02-06/12847.html>.
- [2] 冯燕,卢亦愚,严菊英,等. 荧光定量 RT-PCR 技术快速检测 SARS 病毒核酸[J]. 中国病毒学, 2005,20(3):228-231.
- [3] 国家卫生部办公厅,国家卫生健康委员会医政医管局办公室. 医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法[OB/OL]. (2010-12-06) [2010-12-10]. <http://www.nhc.gov.cn/xxgk/pages/viewdocument.jsp?dispatchDate=&staticUrl=/zwgkzt/wsbysj/201012/49981.shtml>.
- [4] 国家卫生健康委办公厅,科技教育司办公室. 新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)[OB/OL]. (2020-01-23)[2020-02-06]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s7948/202001/0909555408d842a58828611dde2e6a26.shtml>
- [5] 国家卫生健康委办公厅,国家科技教育司办. 关于印发新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)的通知[OB/OL]. (2020-01-23) [2020-01-23]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202001/0909555408d842a58828611dde2e6a26.shtml>.
- [6] 国家卫生健康委办公厅. WS/T 505-2017 定性测定性能评价指南[S]. 北京:国家卫生健康委办公厅,2017.
- [7] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2016.
- [8] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02-A009 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2018.